

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Pharmazeutische Abteilung

Auslösung einer lokalen Leukozytenreaktion
durch Bakterien und
Bakterienprodukte und ihre Beeinflussbarkeit
durch Lipopolysaccharide

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

BERNHARD ECKLIN

von Basel und Le Locle

Basel 1960

1979

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag von
Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. h.c. Rolf Meier

Tag der Promotion: 18. Dezember 1959

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung
von Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. h.c. Rolf Meier,
dem ich für sein Interesse und seine grosszügige Förderung meinen
herzlichsten Dank ausspreche.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch Frau Dr. B. Schär sowie
Herrn Dr. L. Neipp für zahlreiche praktische Hinweise.

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Pharmazeutische Abteilung

Auslösung einer lokalen Leukozytenreaktion
durch Bakterien und
Bakterienprodukte und ihre Beeinflussbarkeit
durch Lipopolysaccharide

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von
BERNHARD ECKLIN
von Basel und Le Locle

Basel 1960

AUS DEN WISSENSCHAFTLICHEN LABORATORIEN DER
CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, BASEL, PHARMAZEUTISCHE ABTEILUNG

AUSLÖSUNG EINER LOKALEN LEUKOZYTENREAKTION DURCH BAKTERIEN UND BAKTERIENPRODUKTE UND IHRE BEEINFLUSSBARKEIT DURCH LIPOPOLYSACCHARIDE

VON

B. ECKLIN

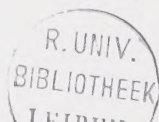
(Eingegangen am 22-12-1959).

EINLEITUNG

Trotzdem seit langem bekannt ist, dass die lokale Leukozytenreaktion für den lokalisierten Entzündungsprozess und Infekt von entscheidender Bedeutung ist (1), liegen kaum Untersuchungen vor, die diese Reaktion im tierischen Organismus in quantitativer Weise mit den auslösenden bzw. reaktiven Mechanismen in Beziehung setzen. Dies beruht zum Teil darauf, dass erst in letzter Zeit durch die Arbeiten von R. MEIER und SCHÄR (2, 3, 4, 5), HARRIS (6) etc. klarere Einblicke in den biochemischen Zusammenhang der Leukozytenreaktion erhalten wurden, zum Teil darauf, dass eine geeignete Methode fehlte.

Die biochemische Analyse gelang vor allem durch Untersuchung der leukozytären Emigration *in vitro*. Die emigrationsfördernde Wirkung gramnegativer Bakterien wurde auf die aus ihnen extrahierbaren Lipopolysaccharide zurückgeführt; bei grampositiven Bakterien handelt es sich wahrscheinlich um analoge, aus dem Gewebe freigesetzte Stoffe. Die Wirkung dieser Stoffe wurde quantitativ charakterisiert. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, den Effekt lebender Bakterien mit demjenigen ihrer Lipopolysaccharide zu vergleichen.

Eine quantitative Charakterisierung der Wirkung solcher Stoffe auf die Leukozytenansammlung *in vivo* ist bisher nicht erfolgt. Es war hierfür notwendig, eine geeignete Versuchsanordnung auszuarbeiten, welche die Wanderungseigenschaften des Leukozyten unter den Be-



dingungen des intakten Organismus in quantitativer Weise zu untersuchen gestattet.

Ein solche Untersuchung der Verhältnisse *in vivo* sollte des weiteren die Möglichkeit ergeben, den Zusammenhang der Leukozytenansammlung mit der Infektoresistenz festzustellen. Von LANDY u. PILLEMER (7), BOEHME u. DUBOS (8), R. MEIER *et al.* (9, 10), etc. wurde gefunden, dass verschiedene bakterielle Stoffe vom Lipopolysaccharidtypus, welche in der *in vitro*-Anordnung die Leukozytenwanderung fördern, an der weissen Maus eine starke prophylaktische Wirksamkeit gegenüber bakteriellem Infekt zeigen. Es war von Interesse zu untersuchen, in welchem Zusammenhang diese beiden Lipopolysaccharidwirkungen stehen und ob sich zwischen stimulierter Leukozytenwanderung und gesteigerter Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen eine Parallelität ziehen lässt.

Ein solcher Zusammenhang ist schon für Lipopolysaccharidwirkungen auf andere Partialfaktoren des Schutz- und Abwehrmechanismus diskutiert und zum Teil nachgewiesen worden, so z.B. bei der Phagozytose der Leukozyten (11-14), bei der Phagozytose der Zellen des RES (8, 15, 16), sowie beim Properdinsystem (7, 17). Die Bedeutung der Leukozytenemigrationswirkung kann nur dann entschieden werden, wenn die wanderungsbeschleunigende Lipopolysaccharidwirkung auch am intakten Organismus nachgewiesen werden kann.

Die Wanderungseigenschaften der Leukozyten im Organismus werden erst dann manifest, wenn sie aktiv durch die Kapillarwand ins Gewebe übertreten. Das fassbare Resultat ist eine lokale Ansammlung von Leukozyten. Es ist prinzipiell zu erwarten, dass bei gleichbleibenden Auslösungsbedingungen die Zahl der angesammelten Zellen umso grösser ist, je stärker ihre Wanderungsfähigkeit ausgebildet ist. Der experimentellen Prüfung dieser Annahme stellt sich die Schwierigkeit entgegen, dass eine solche Ansammlung von Leukozyten immer eine Teilerscheinung der Entzündung darstellt und dass der auslösende Reiz meist oder immer noch andere entzündliche Reaktionen zur Folge hat, welche eine quantitative Erfassung der leukozytären Reaktion erschweren. Man muss also nach einer Versuchsanordnung suchen, bei der diese störenden Faktoren zurücktreten und die leukozytäre Antwort auf den Reiz sich möglichst isoliert untersuchen lässt.

Das subcutane Gewebe stellt für eine experimentelle Leukozytenansammlung, etwa durch subcutane Injektion einer Reizsubstanz, kein geeignetes Objekt dar. Auch bei der Granuloma pouch — Methode von Selye, mit der zwar eine Abgrenzung des Vorgangs erreicht werden kann, stehen neben der leukozytären Reaktion exsudative, haemorrha-

gische und bindegewebige Prozesse im Vordergrund (18, 19). Demgegenüber bieten die serösen Höhlen den Vorteil der klaren Begrenztheit gegenüber dem umliegenden Gewebe; es zeigt sich ferner, dass die *Bauchhöhle der weissen Maus* für unsere Untersuchung ein besonders günstiges Objekt darstellt, weil hier exsudative Vorgänge völlig zurücktreten und es auch mit stark reizenden Mitteln oder virulenten Bakterien schwer ist, Hyperaemie, Exsudat und Austritt von Erythrozyten aus den Kapillaren zu erzielen. Eine Einwanderung von Leukozyten in die Bauchhöhle tritt dagegen bei geeignetem Vorgehen regelmässig ein. Die mit der ausgearbeiteten Methode erhaltenen Resultate belegen die quantitative Relation zwischen auslösendem Reagens und eintretender Reaktion und die Verwendbarkeit für die Beantwortung verschiedener Fragen.

METHODE

Die Substanzen werden männlichen weissen Mäusen von 18-22 g Gewicht intraperitoneal injiziert. Injektionsvolumen stets 0,2 ml. Nach der vorgesehenen Zeit — bei Untersuchung der Dosis/Wirkungsbeziehung einheitlich nach 16-20 Stunden — werden die Tiere durch Genickbruch getötet und auf einem kleinen Holzbock auf dem Rücken liegend befestigt. Die Haut über dem Abdomen wird entfernt (ventral und lateral) und darauf der Bock derart seitlich umgestellt, dass das Tier horizontal an der senkrechten Fläche hängt. An der unteren Seite des etwas durchhängenden Bauchfellsackes werden drei kleine Inzisionen angebracht; sie sollen für eine dünne Scherenbranche durchgängig, jedenfalls nicht zu gross gemacht werden, damit ein Prolaps von Darmschlingen verhindert wird. An der oberen, gegenüberliegenden Seite wird ebenfalls eine kleine Oeffnung angebracht. Durch diese wird aus einer Injektionsspritze mittels einer geknüpften Hohlsonde genau 5,0 ml der Spülflüssigkeit in die Bauchhöhle gebracht, und zwar so, dass durch Ändern der Position des Hohlsondenendes möglichst alle Teile der Bauchhöhle gleichmässig irrigiert werden. Der Rand der oberen Oeffnung wird dabei mit einer Pinzette etwas abgehoben; die Flüssigkeit wird so langsam hineingespritzt, dass sie aus dieser Tasche nicht überläuft. So tropft unten praktisch die gesamte Spülmenge in das bereitgestellte Gefäss, in einer optimalen Geschwindigkeit von ca. einem Tropfen pro Sekunde. Aus dem Gefäss kann sie nochmals aufgesogen und ihr Volumen an der Spritzenskala abgelesen werden. Da am unbehandelten Tier von 5,0 ml injizierter Spülflüssigkeit immer ziemlich genau 4,7-4,8 ml aufgesogen werden können — also praktisch

100 %, da das Auffanggefäß vorher trocken war —, kann auf diese Weise ein allfälliges Exsudat festgestellt und gemessen werden.

Die Spülflüssigkeit besteht aus physiologischer Kochsalzlösung mit einem Heparinzusatz von 1 : 40'000. Nach dem Spülvorgang werden die suspendierten Zellen in üblicher Weise mit Türk'scher Lösung 1 : 10 verdünnt und unter dem Mikroskop gezählt. Eine Zusammenballung von Zellen in der Zählkammer kann verhindert werden, wenn vorher die zur Volumenmessung wiederaufgesogene Spülflüssigkeit unter kräftigem Druck ins Gefäß gespritzt und diese Manipulation 1-2 mal wiederholt wird.

Um mit dieser Methode einwandfreie Resultate zu erzielen, müssen folgende Punkte beachtet werden.

Schon beim unbehandelten Tier lassen sich aus der Bauchhöhle Zellen in einer Anzahl herausspülen, die bei der Prüfung von leukozytenanlockenden Stoffen unbedingt zu berücksichtigen ist (20, 21). Es handelt sich um grosse runde Zellen mit blassem Plasma und exzentrisch liegendem, rundem oder nierenförmigem Kern sowie um etwas kleinere Zellen, die mehr Mono- und Lymphozyten ähnlich sind. Es zeigt sich aber, dass die Zahl dieser Zellen sehr konstant ist : Bei 31 Mäusen war der Durchschnittswert 915 Zellen/mm³ Spülflüssigkeit (absolut ca. 4,6 Millionen Zellen pro Maus) mit einer Standardabweichung von ± 226 . 690-1140 Zellen/mm³ Spülflüssigkeit sind also als normale Werte zu betrachten.

Es ist darauf zu achten, dass die zu prüfende Substanz in pyrogenfreier Form in die Bauchhöhle gebracht wird. Möglicherweise beruht die Wirkung zahlreicher Methoden, die in der Literatur zur Gewinnung von Leukozyten aus serösen Höhlen angegeben werden, auf der Beimengung von Bakterien und Bakterienprodukten. Schon die Pyrogenfreiheit des Lösungsmittels ist von wesentlicher Bedeutung; die kürzliche Mitteilung von FRUHMANN (22) hierüber können wir bestätigen, indem Kontrollversuche mit physiologischer Kochsalzlösung, die wir stets mit bidestilliertem Wasser und Natrium chloratum puriss. (Merck) herstellten, nie Leukozytenanlockung ergaben.

Über die Zahl der für eine gesicherte Aussage notwendigen Einzelwerte (jeder Einzelwert entspricht einer Maus) lässt sich folgendes sagen : Da es sich um ein biologisches System mit vielen Variablen und Unbekannten handelt, streuen die Einzelwerte zum Teil beträchtlich. Wird aber eine Substanz über einen breiteren Konzentrationsbereich geprüft, so geben 3 Einzelwerte pro Konzentration im allgemeinen schon ein recht zuverlässiges Bild, während 5-6 Mäuse einen Durchschnittswert liefern, der nicht mehr wesentlich vom Mittelwert grösserer

Serien entfernt liegt. Dies gilt namentlich für Bereiche bis zu 4-5000 Zellen/mm³ Spülflüssigkeit; bei noch stärkerer Zellreaktion weichen die Einzelwerte in vermehrtem Mass voneinander ab.

Die Vermehrung der Zellzahl in der Bauchhöhle durch wirksame Substanzen liegt in folgenden Grössenordnungen (unter Leukozyten werden im folgenden alle herausgespülten Zellen, auch die schon vorher vorhanden gewesen, verstanden):

TABELLE I

Ausgangsniveau resp. keine Wirkung: ca. 1000 (915 $\pm$ 226, s. oben) Leukozyten/mm³ Spülflüssigkeit

Schwache Wirkung:	ca. 2000 Leukozyten/mm ³	Spülflüssigkeit
Starke Wirkung:	ca. 5000 Leukozyten/mm ³	"
Sehr starke Wirkung:	ca. 7000 Leukozyten/mm ³	"
	und darüber.	

Werte von über 10'000 Leukozyten/mm³ werden nicht häufig erreicht. 10'000 Leukozyten/mm³ entsprechen absolut einer Zahl von 50 Millionen Leukozyten pro Maus, das ist beträchtlich mehr als die Gesamtzahl der in der Blutbahn zirkulierenden Leukozyten.

RESULTATE

A. — *Auslösung der Leukozytenansammlung*

1) *Chemotaktisch wirksame Stoffe der Literatur.*

In der Literatur finden sich zahlreiche qualitative Angaben über Ansammlung von Leukozyten in den serösen Höhlen nach Applikation verschiedenartigster Stoffe. So werden eine Reihe von Methoden beschrieben, mit denen man Leukozyten (meistens zu Phagozytoseversuchen) aus der Bauchhöhle verschiedener Tierarten gewinnen kann. Es schien zweckmässig, einige dieser Stoffe mit unserer auf quantitative Resultate ausgehenden Methode zu prüfen. Es waren dies: Physiologische Kochsalzlösung (23, 24, 25), Glykogen 5 mg/kg (26), sterile Bouillon (27, 28), Stärke 0,1 mg—1 g/kg (23) und steriles Paraffinöl (29, 30).

Keiner dieser Stoffe löste in unserem Test eine Leukozytenansammlung aus, mit Ausnahme des Paraffinöls, das in vereinzelt Fällen eine mässige Erhöhung der Zellzahl bewirkte (die milchige Trübung des Spülwassers wurde durch massenhafte feinste Oeltröpfchen bedingt).

2) Lipopolysaccharide (LPS).

Das wesentliche Objekt unserer Untersuchung waren Lipopolysaccharide von Bakterien. Es wurden zwei Fraktionen ausgewählt, die Dr. F. W. KAHNT in den chemischen Laboratorien der CIBA aus *Proteus vulgaris* OX 19 hergestellt hatte und von denen bereits folgende Wirkungen bekannt waren: Fraktion I, nach Herstellungsgang und chemischer Analyse ein weitgehend gereinigtes, relativ leicht lösliches Lipopolysaccharid, stimuliert die Leukozytenwanderung *in vitro* in einer Minimalkonzentration von 10^{-10} ; im Infektabwehrversuch an der

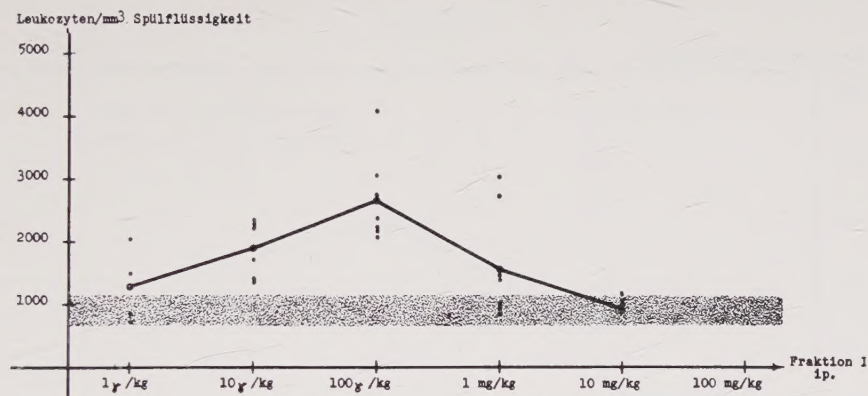


ABB. 1

Leukozytenansammlung in der Bauchhöhle nach intraperitonealer Injektion von *Proteus*-Fraktion I, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung. Injektionsvolumen 0,2 ml. Abszisse: Injektionsdosis. Ordinate: Anzahl Leukozyten pro mm³ aufgefangener Spülflüssigkeit. Untersuchung nach 16-20 Stunden Einwirkungsdauer. Die grau hervorgehobene Zone gibt den Bereich der Ausgangswerte an (s. Text).

weissen Maus nach MEIER und NEIPP (9, 10) zeigt sie eine prophylaktische Wirksamkeit in der Dosis von 10 γ — 5 mg/kg. Fraktion II enthält weniger LPS, daneben u.a. 75 % andere, zum Teil anorganische Bestandteile und ist schwerer löslich; ihre Minimalkonzentration bei der Leukozytenemigration *in vitro* beträgt 10^{-7} . Infektabwehr: wirksam bei 25 u. 75 mg/kg.

Die *Fraktion I* wurde in physiologischem NaCl gelöst und in verschiedenen Dosen intraperitoneal injiziert. Die Leukozytenzahlen nach 16-20 Stunden gehen aus der ABB. 1 hervor. Die Zellzahl nimmt mit steigender LPS-Dosis zunächst zu bis zu einem Maximum von 2670 Leukozyten/mm³ Spülflüssigkeit bei 100 γ/kg; mit weiterer Erhöhung der LPS-Dosis tritt ein Absinken der Kurve ein, bei der höchsten Dosis (10 mg/kg) ist der Ausgangswert wieder erreicht. Bei dieser Dosis

gehen bereits einzelne Tiere zugrunde. Noch weitere Erhöhung hat eine rapid ansteigende Letalität zur Folge.

Die Einwirkungsdauer von 16-20 Stunden wurde auf Grund des (hier nicht aufgeführten) Zeit/Wirkungsdiagramms gewählt, welches den folgenden Kurvenverlauf zeigt: in den ersten 6-8 Stunden bleibt die Zellzahl konstant (in mehreren Fällen schien sie sogar abzunehmen) und steigt dann innerhalb der nächsten 8-12 Stunden auf das Maximum, welches somit nach ca. 16-18 Stunden erreicht wird. Darauf bleibt sie längere Zeit auf diesem Niveau und beginnt erst nach mehreren Tagen wieder auf den Ausgangswert zurückzugehen (Dosis: 1 mg/kg).

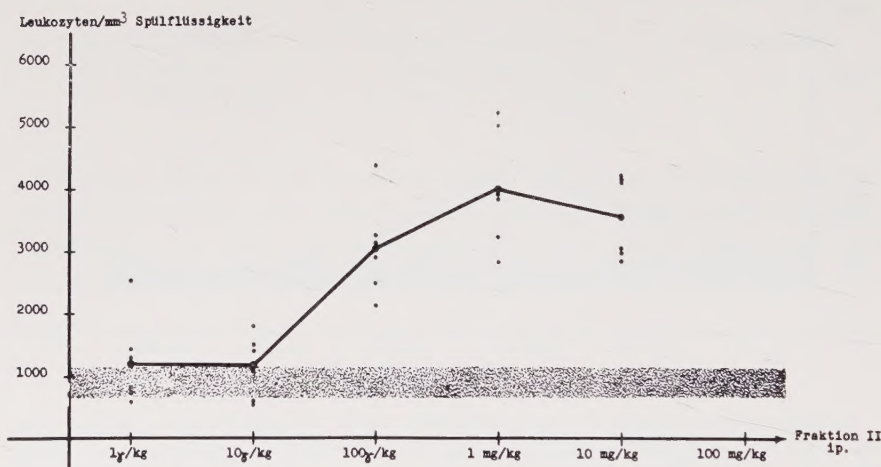


ABB. 2

Leukozytenansammlung nach intraperitonealer Injektion von Proteus-Fraktion II. Erklärungen s. Legende zu Fig. 1. Ein weiteres Beispiel für die Wirkung dieser Fraktion gibt die Fig. 7 (ausgezogene Kurve).

Das Dosis/Wirkungsdiagramm der *Fraktion II* zeigt die ABB. 2.

Im Vergleich zur Fraktion I benötigt die Fraktion II für ihre optimale Wirkung eine höhere Konzentration, erreicht aber andererseits bedeutend höhere Leukozytenzahlen. Auch hier fällt die Kurve bei der höchsten Dosis wieder ab. Die (nicht aufgeführte) Zeit/Wirkungskurve verläuft im Prinzip genau wie diejenige der Fraktion I: nach einer Latenzzeit von ca. 4 Stunden Ansteigen innert 15-20 Stunden auf das Maximum von 4410 Leukozyten/mm³ (Mittel aus 30 Werten), dann über Tage hin langsames Abfallen (Dosis: 1 mg/kg). Die Substanz ist weniger toxisch, Dosen von 100 mg/kg werden noch vertragen.

3) Abgetötete Bakterien.

Als weiteres Beispiel eines „Bakterienproduktes“ wurde die leukozytenanlockende Wirkung abgetöteter Bakterien untersucht. Eine 24 h — Kultur von *Klebsiella pneumoniae* (Friedländer) wurde bei 80° 30' abgetötet, zentrifugiert und drei mal mit physiologischem NaCl gewaschen. Suspensionen verschiedener Konzentrationen (bezogen auf das Trockengewicht der Bakterien) wurden hergestellt und intraperitoneal injiziert. Das Resultat zeigt die Tabelle II.

TABELLE II

Bakterien, Injektionsdosis (bezogen auf Trockengewicht)	Leukozyten/mm ³ Spülflüssigkeit
10 γ /kg	1840
	1420 1605
	1560
100 γ /kg	1660
	2640 1785
	1060
1 mg/kg	1800
	5280 3485
	3380
10 mg/kg	3740
	2580 3475
	4100
100 mg/kg	2080
	1720 2245
	2940

Auch hier erhält man eine ganz ähnliche Dosisabhängigkeit der Leukozytenzahlen wie im Falle der Lipopolysaccharide: Zuerst Ansteigen auf ein Maximum, dann mit weiter zunehmender Dosis Sinken auf ein niedrigeres Niveau.

4) Lebende Bakterien.

Weiterhin wurde die Leukozytenreaktion auf die Injektion lebender Bakterien untersucht, und zwar wiederum besonders ihre quantitative Abhängigkeit von der injizierten Bakterienmenge. Eine 24 h — Kultur von *E. coli* (Stamm: CN 348) wurde mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt; von verschiedenen Verdünnungen wurden je 0,2 ml

intraperitoneal injiziert. Die Streuungen der Einzelwerte sind hier sehr gross, so dass sich erst aus einer grösseren Anzahl von untersuchten Tieren ein zuverlässiges Bild ergibt. ABB. 3 gibt einen solchen Versuch wieder. In dieser Abbildung sind auch die Überlebenszahlen bei den einzelnen Infektionsdosen angegeben; diese wurden aus Parallelversuchen mit einer grösseren Anzahl von Tieren (7-16 Mäuse pro Dosis) ermittelt.

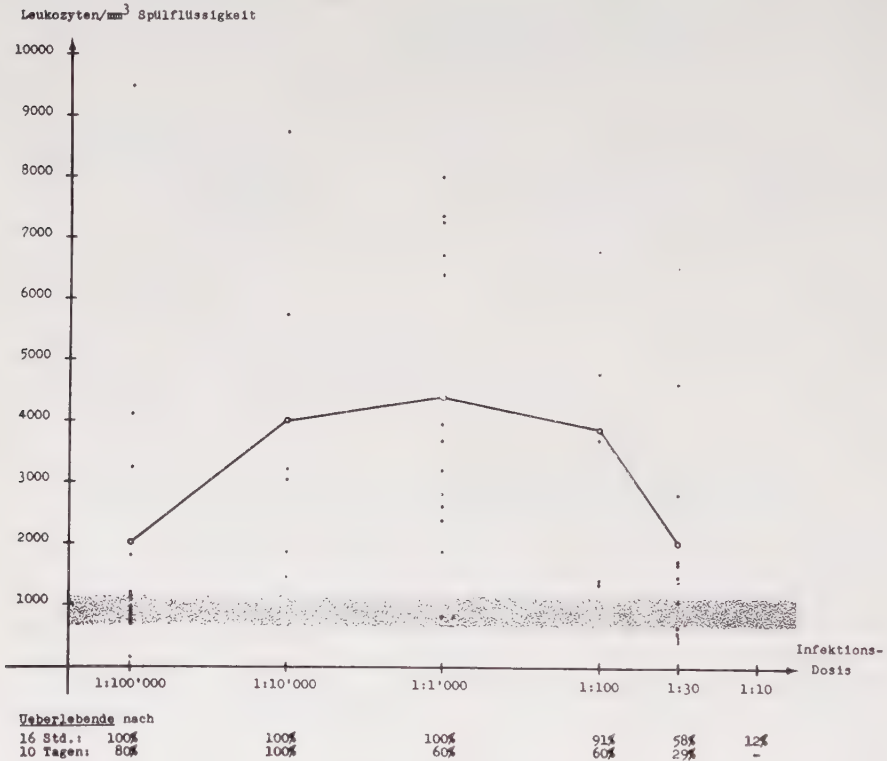


ABB. 3

Leukozytenansammlung nach intraperitonealer Injektion von lebenden Colibakterien. 24 Stunden-Kultur von *E. coli* (Stamm CN 348) verdünnt mit physiol. Kochsalzlösung; Injektionsvolumen 0,2 ml. Abszisse: Verdünnungsgrad der Kulturflüssigkeit. Am Fuss der Figur: Prozentsatz der nach 16 Stunden bzw. 10 Tagen überlebenden Tiere.

Aus der ABB. 3 geht hervor, dass 1) sowohl die Leukozytenzahl wie die Mortalität abhängig ist von der Infektionsdosis, 2) das Charakteristikum der Leukozytenkurve für Lipopolysaccharide und abgetötete Bakterien, nämlich der Abfall bei hohen Dosen, auch hier wieder zu finden ist, 3) die höchste Mortalität mit der stärksten Depression der Leukozytenzahl zusammenfällt. Die Leukozytenwerte der höheren Infektionsdosen

stellen bereits eine Selektion dar, da die Tiere zu einem Teil innerhalb von 16 Stunden zugrundegehen, vor dem Zeitpunkt also, in welchem die Untersuchung erfolgt (bereits gestorbene Tiere wurden nicht mehr untersucht).

Von den beschriebenen Ergebnissen fällt vor allem folgendes auf : 1) Von den zwei untersuchten Proteus fraktionen löst diejenige mit der weit stärkeren Wirksamkeit auf die Leukozytenwanderung *in vitro* eine wesentlich schwächere Leukozytenansammlung *in vivo* aus. 2) Die Leukozytenreaktion auf hohe Dosen von LPS, abgetöteten und lebenden Bakterien ist gegenüber derjenigen auf mittlere Dosen nicht verstärkt, wie zu erwarten wäre, sondern im Gegenteil abgeschwächt bis vollständig unterdrückt. Die Bedeutung dieser Befunde wird später zu diskutieren sein.

B. — *Beeinflussung der lokalen Leukozytenreaktion durch in die Blutbahn injiziertes Lipopolysaccharid*

Die bisher dargelegten Resultate erlauben, die Frage des Zusammenhanges der lokalen Leukozytenreaktion auf lebende Bakterien mit dem Mechanismus der Infektüberwindung zu untersuchen. Zwei Voraussetzungen bestimmen den Versuchsplan : 1) Tödliche Dosen lebender Bakterien lösen eine schwache oder fehlende, subletale Dosen dagegen eine kräftige lokale Leukozytenreaktion aus (ABB. 3). Von den *in vitro*-Versuchen ist bekannt, dass niedrige LPS-Dosen die Migration der Leukozyten fördern, hohe sie hemmen. Es ist deshalb abzuklären, ob die fehlende lokale Reaktion bei hohen Infektionsdosen durch Lipopolysaccharid bedingt sein kann, das aus dem Infektionsherd herausgelöst worden und zur Resorption gelangt ist. 2) Die Behandlung mit Lipopolysacchariden führt bei Mäusen unter bestimmten Bedingungen zu einer derartigen Resistenzerhöhung, dass sie an sich tödlichen Infektionsdosen nicht mehr erliegen (7-10). Zur Interpretation dieser Wirkung ist festzustellen, ob und in welcher Weise das Lipopolysaccharid hierbei die leukozytäre Reaktion am Ort der Infektion beeinflusst.

Die Frage einer möglichen Hemmwirkung resorbierten Lipopolysaccharids auf die Leukozytenansammlung am Infektionsherd versuchten wir auf folgende Weise abzuklären. Der Versuch mit lebenden Bakterien (ABB. 3) wurde wiederholt; gleichzeitig mit der intraperitonealen Infektion wurde den Tieren von der gereinigteren LPS-Fraktion I die Dosis von 1 mg/kg intravenös injiziert. Das Resultat zeigt die ABB. 4. Die lokale Reaktion auf die Injektion lebender Bakterien wird durch

die hier injizierte Dosis von LPS vollkommen unterdrückt. Gleichzeitig steigt die Empfindlichkeit der Tiere gegenüber der Infektion an, wie die Überlebenszahlen bei den einzelnen Infektionsdosen, verglichen mit denjenigen der ABB. 3, zeigen. Auch hier geben die Leukozytenzahlen für die höchsten Infektionsdosen kein ganz genaues Bild, da nur die nach 16 Stunden noch überlebenden und somit (im Vergleich zu den bereits gestorbenen) widerstandsfähigeren Tiere berücksichtigt sind.

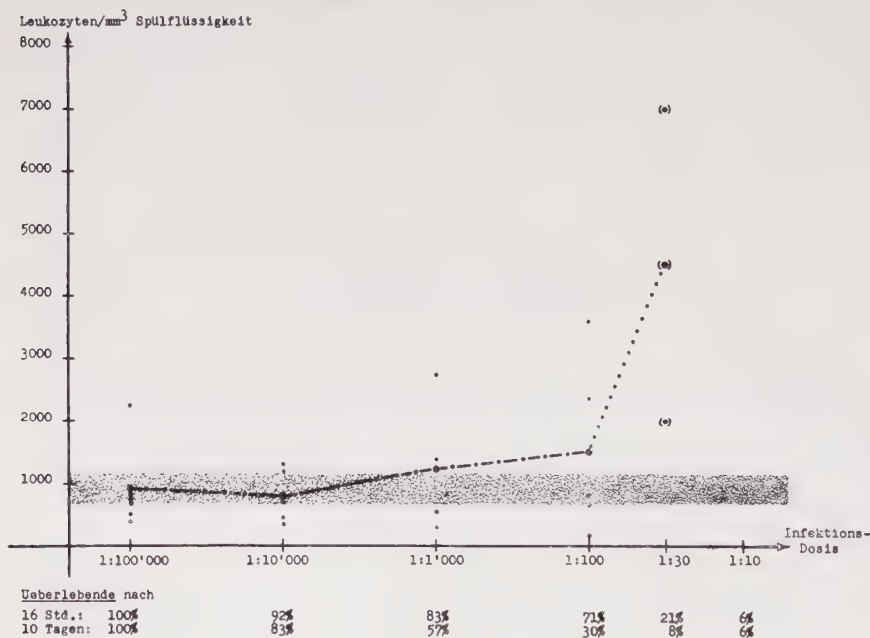


ABB. 4

Wirkung einer einheitlichen intravenösen Dosis (1 mg/kg) von Proteus-Fraktion I auf die durch lebende Colibakterien ausgelöste Leukozytenansammlung. Gabe der Proteus-Fraktion I gleichzeitig mit der Infektion.

Es geht aus diesem Versuch hervor, dass die Anwesenheit einer hohen Konzentration im Organismus gleichzeitig mit erfolgreicher Infektion und damit wohl auch eine rasche und starke LPS-Resorption aus dem Infektionsherd eine Hemmung der leukozytären Reaktion zur Folge haben kann.

Die unter diesen Versuchsbedingungen zu beobachtende Infektverschlimmerung durch LPS steht im Gegensatz zur erwähnten resistenzerhöhenden Wirksamkeit dieser gleichen Stoffe unter anderen Bedingungen. Es ist bekannt, dass LPS bevorzugt dann eine Resistenzsteigerung gegenüber bakterieller Infektion bewirken, wenn zwischen ihrer

Applikation und der Infektion eine gewisse Zeit verstreicht (7-10). Das Minimum dieser Zeitspanne liegt bei etwa 6 Stunden; die Schutzwirkung hält darauf mehrere Tage an. Es stellt sich die Frage, ob unter diesen veränderten Bedingungen auch der LPS-Effekt auf die lokale Leukozytenreaktion ein anderer ist.

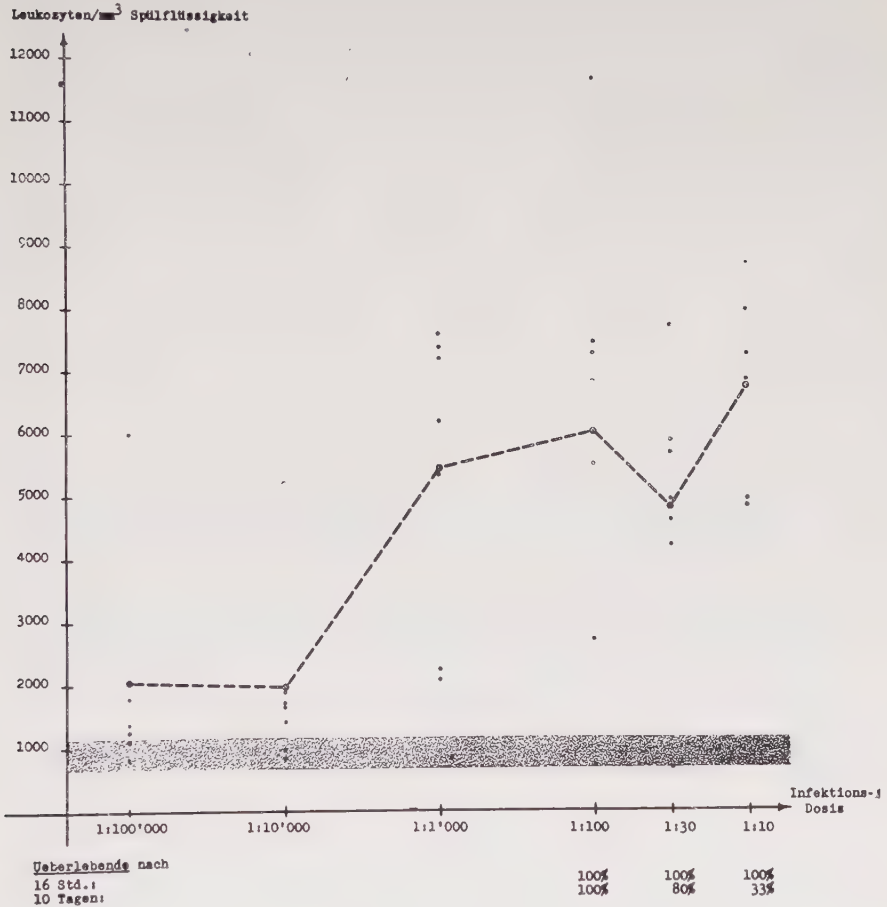


ABB. 5

Wirkung einer einheitlichen intravenösen Dosis (1 mg/kg) von Proteus-Fraktion I auf die durch lebende Colibakterien ausgelöste Leukozytenansammlung. Hier erfolgt die Gabe der Proteus-Fraktion I zwei Tage vor der Infektion (prophylaktische Anwendung).

Einer Versuchsserie von Mäusen wurde wiederum 1 mg/kg LPS der Fraktion I intravenös injiziert. Zwei Tage darauf wurden die Tiere in gleicher Weise wie im Versuch der ABB. 3 und 4 mit *E. coli* infiziert. Die Leukozytenzahlen sowie die Überlebendenzahlen gibt die ABB. 5 wieder.

Das Intervall von 2 Tagen zwischen den beiden Injektionen hat im Vergleich zum Versuch der Abb. 4 zwei wesentliche Änderungen am Verlauf der Leukozytenkurve zur Folge: 1) Die Blockierung der lokalen Antwort auf die Infektion ist aufgehoben, das Tier zeigt eine zelluläre Reaktion; 2) die Kurve fällt jetzt im zweiten Teil nicht mehr ab, sondern

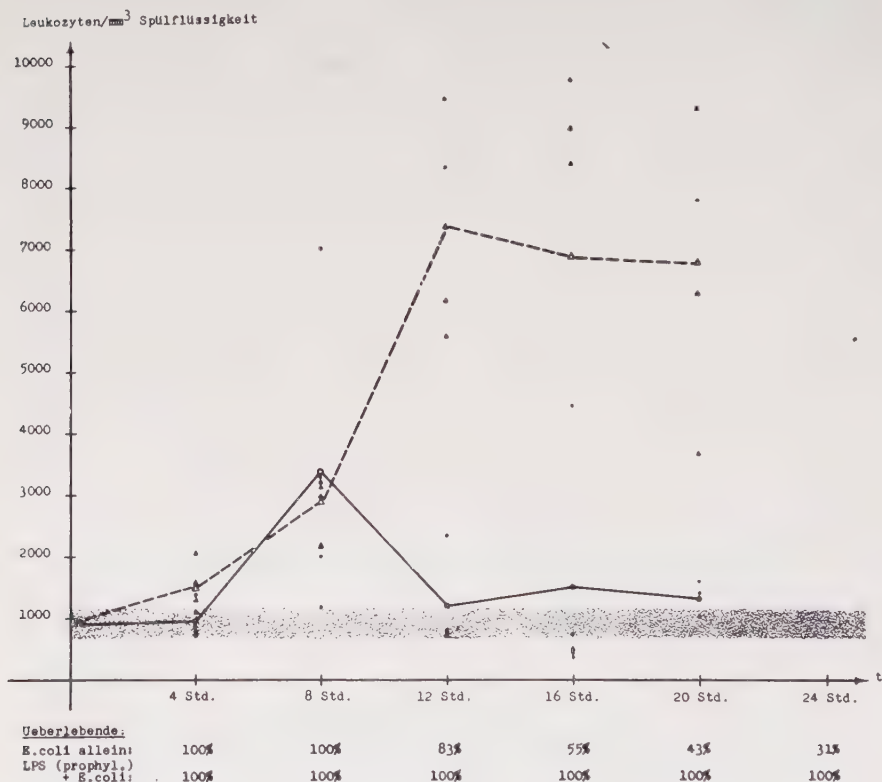


ABB. 6

Zeitlicher Verlauf der Leukozytenreaktion auf die intraperitoneale Injektion einer einheitlichen Dosis lebender Colibakterien (0,2 ml einer 1 : 30 verdünnten Kulturflüssigkeit), ohne zusätzliche Behandlung (—) und nach prophylaktischer Behandlung der Tiere mit einer einheitlichen intravenösen Dosis (1 mg/kg) von Proteus-Fraktion I (— — —). Am Fuss der Figur: Prozentsatz der überlebenden Tiere („LPS“ Proteus-Fraktion I).

steigt mit zunehmender Infektionsdosis weiter an; der höchsten Infektionsdosis entspricht die stärkste Leukozytenreaktion. Parallel dazu ist (gemessen an der Zahl der Überlebenden) die infektfördernde in eine infekthemmende Wirkung verwandelt worden.

Den zeitlichen Verlauf der Leukozytenreaktion beim unvorbehandel-

ten und beim LPS-vorbehandelten Tier zeigt die Abb. 6 (Infektionsdosis : Kulturverdünnung 1 : 30, 0,2 ml).

Beim unvorbehandelten Tier bleibt bei der gewählten Infektionsdosis die Leukozytenantwort auf die Infektion praktisch vollkommen aus, während sie beim vorbehandelten Tier innert 12 Stunden auf sehr hohe Werte ansteigt. Wiederum fällt mit niedriger Leukozytenzahl eine hohe Mortalität zusammen, während die Tiere mit starker Zellreaktion überleben. Die mögliche Ursache dieser Reaktionsänderung in Abhängigkeit von der LPS-Wirkung wird später zu diskutieren sein.

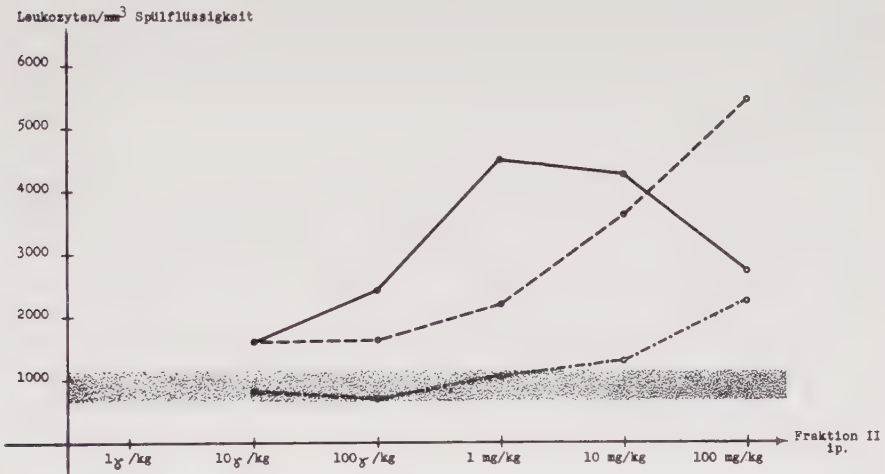


ABB. 7

Leukozytenansammlung nach intraperitonealer Injektion von Proteus-Fraktion II, ohne zusätzliche Behandlung (—), bei gleichzeitiger Gabe einer einheitlichen intravenösen Dosis (1 mg/kg) von Proteus-Fraktion I (— · — · —) und nach prophylaktischer Gabe einer einheitlichen intravenösen Dosis (1 mg/kg) von Proteus-Fraktion I (— — —).

In Anbetracht der *in vitro* nachweisbaren direkten Wirkung des LPS auf die Leukozyten darf angenommen werden, dass die Hemmung (ABB. 4) resp. Förderung (ABB. 5 und 6) der leukozytären Reaktion *in vivo* ebenfalls über eine mehr oder weniger direkte Einwirkung auf die Leukozyten zustandekommt. Es bleibt notwendig nachzuweisen, ob der beschriebene Effekt unabhängig von einem Einfluss des LPS auf Wachstumsvorgänge der Bakterien ist. Da in Form der LPS-Fraktion II ein lebloses Bakterienprodukt zur Verfügung steht, das eine der Reaktion auf lebende Bakterien ganz analoge Leukozytenansammlung auslöst (vergl. ABB. 2 und 3), kann diese Frage dadurch untersucht werden, dass in den Versuchen der Abb. 4 und 5 an Stelle der lebenden Bakterien die Bakterienfraktion II zur Auslösung der Leukozytenreaktion benützt

wird; die Hemmung und Förderung der so ausgelösten Reaktion erfolgt in der Weise, dass den Tieren gleichzeitig resp. prophylaktisch 1 mg/kg der gereinigteren LPS-Fraktion I intravenös injiziert wird. Das Resultat eines solchen Versuches zeigt die Abb. 7.

Es ergibt sich, dass LPS (Fraktion I) in genau gleicher Weise wie in den Versuchen mit lebenden Bakterien die durch leblose Bakterienprodukte ausgelöste Leukozytenreaktion bei gleichzeitiger Applikation unterbindet, bei prophylaktischer Applikation fördert.

Die beschriebenen Befunde beweisen, dass eine intraperitoneal ausgelöste Leukozytenansammlung durch intravenös injiziertes LPS (Fraktion I) in hemmendem oder förderndem Sinn beeinflusst werden kann, je nach den gewählten Versuchsbedingungen. Es spielt dabei keine Rolle, ob das auslösende Agens in der Bauchhöhle lebende Bakterien oder leblose Bakterienprodukte sind.

Die Hemmung der Reaktion durch gleichzeitig mit der Infektion intravenös appliziertes LPS macht wahrscheinlich, dass die geringe oder fehlende Reaktion auf hohe Infektionsdosen sowie auf hohe Dosen lebloser Bakterienprodukte auf einer Resorption von Lipopolysacchariden aus dem lokalen Herd in die Blutbahn beruht. Die Änderung der Leukozytenreaktion bei Vorbehandlung mit LPS ist schwerer zu interpretieren, doch lässt sie sich auch als eine direkte Wirkung auf die Leukozyten auffassen.

C. — *Beeinflussung der lokalen Leukozytenreaktion durch lokal injiziertes Lipopolysaccharid*

Zur weiteren Charakterisierung des Effektes ist es notwendig festzustellen, ob die intravenöse und die intraperitoneale Behandlung mit LPS gleichartige Effekte auf die lokale Leukozytenreaktion ausüben. Zur Beantwortung dieser Frage muss untersucht werden, ob die gleichzeitige intraperitoneale Behandlung, die Überschuss an lokal vorhandenem LPS nachahmt, eine der intravenösen Behandlung analoge Hemmung bewirkt, und weiterhin ob die intraperitoneale Vorbehandlung mit LPS gleiche Schutzwirkung gibt wie die intravenöse Vorbehandlung, anzeigend, dass im wesentlichen ein „allgemeiner“ Effekt der Vorbehandlung Ursache der prophylaktischen Schutzwirkung ist.

Um zu zeigen, dass zunächst lokal vorhandenes LPS prinzipiell die gleichen Wirkungen auf die Leukozytenreaktion ausübt wie das intravenös injizierte, wurden Versuchstiere wiederum mit LPS der Fraktion I gleichzeitig resp. prophylaktisch behandelt (1 mg/kg) und mit *E. coli*

infiziert, wobei diesmal aber das LPS intraperitoneal injiziert wurde. Die Abb. 8 zeigt das Ergebnis dieser Versuche (Verlauf der Mittelwerte von a) Infektion allein, b) gleichzeitige LPS-Behandlung + Infektion, c) prophylaktische LPS-Behandlung + Infektion).

Ein Vergleich mit der Wirkung von intravenös injiziertem LPS (ABB. 3, 4 und 5) zeigt eine weitgehende Übereinstimmung. Die intraperitoneale Applikation des LPS gleichzeitig mit der Infektion, führt wie die intravenöse Injektion zu einer Unterbindung der Leukozytenreaktion, aber in geringerem Ausmass. Parallel dazu wird die Zahl

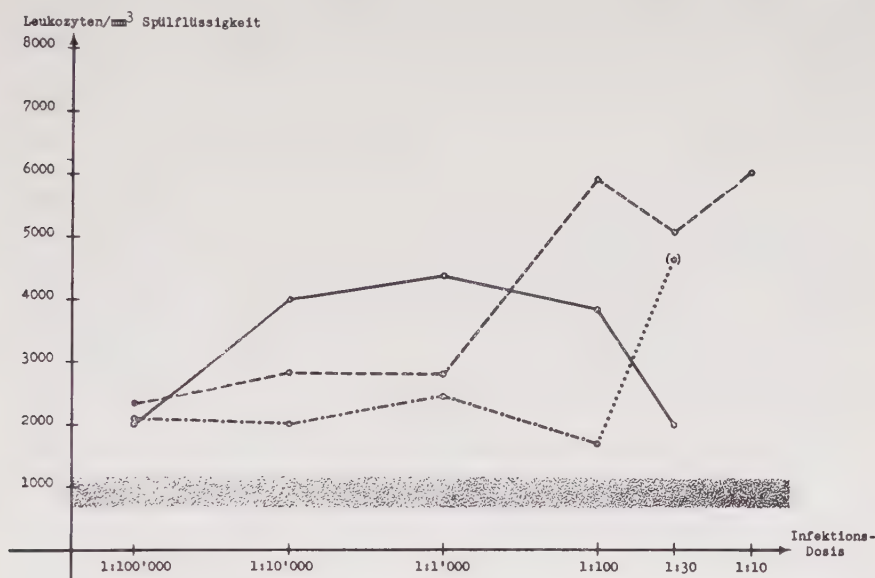


ABB. 8

Leukozytenansammlung nach intraperitonealer Injektion von lebenden Colibakterien, ohne zusätzliche Behandlung (—), bei gleichzeitiger Gabe einer einheitlichen *intra*peritonealen Dosis (1 mg/kg) von Proteus-Fraktion I (---) und nach prophylaktischer Gabe einer einheitlichen *intra*peritonealen Dosis (1 mg/kg) von Proteus-Fraktion I (···).

der überlebenden Tiere (die in der Abb. 8 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht aufgeführt ist) weniger deutlich herabgesetzt. Die prophylaktische Injektion von LPS ruft gleiche Veränderung der Leukozytenreaktion wie bei intravenöser Applikation hervor, namentlich tritt kein Abfall der Leukozytenkurve bei höchsten Infektionsdosen mehr ein. Die Resistenzsteigerung durch prophylaktische Anwendung ist noch verstärkt, 10 Tage nach der Infektion mit der Dosis 1 : 10 leben 80 % der Tiere, gegenüber 33 % bei der intravenösen Applikation.

Die genau gleiche Übereinstimmung der Wirkung von lokal zu-

gesetztem LPS mit derjenigen von intravenös injiziertem kann festgestellt werden, wenn statt der lebenden Colibakterien die Proteusfraktion II zur Auslösung der Leukozytenansammlung verwendet wird.

Im Prinzip ruft somit intraperitoneale und intravenöse Behandlung mit LPS bei simultaner Gabe analoge Hemmung, bei prophylaktischer Gabe analoge Förderung der Leukozytenreaktion hervor. Kleine Unterschiede des quantitativen Ausmasses beruhen wohl darauf, dass die intravenöse und intraperitoneale Gabe von LPS nicht ganz gleiche quantitative Verteilung ergibt und vielleicht auch „lokal“ der Effekt sich etwas unterschiedlich auswirkt. Der Wirkungscharakter der LPS-Behandlung ist somit ein typischer und unabhängig von der Applikationsart.

DISKUSSION

Die Ergebnisse unserer Versuche zeigen, dass die verwendete Methode zur quantitativen Erfassung leukozytärer Reaktionen *in vivo* durchaus geeignet ist. Die Befunde erlauben nun, mehrere Schlussfolgerungen über den Mechanismus des Zustandekommens der Leukozytenreaktion *in vivo* und desjenigen der Lipopolysaccharid (LPS)-Behandlung auf den Ablauf der Infektion zu ziehen.

Lebende Bakterien, abgetötete Bakterien und Polysaccharidfraktionen aus Bakterien rufen nach intraperitonealer Applikation eine dosisabhängige Leukozytenansammlung hervor. Mittlere Dosen zeigen optimale Effekte, bei hohen Dosen fällt die Leukozytenzahl wieder ab. Die Zahl lokal angesammelter Leukozyten ist nicht ohne Einschränkung mit der Grösse des durch LPS hervorgerufenen Auswanderungsareals *in vitro* in Verbindung zu bringen. Ein *in vitro* hochwirksames LPS löst bei lokaler Applikation im tierischen Organismus nur eine geringe Leukozytenreaktion aus, während eine andere Fraktion, die weniger LPS enthält und *in vitro* auch weit schwächer wirkt, eine kräftigere Leukozytenantwort zur Folge hat, die auch derjenigen abgetöteter und lebender Bakterien gleicht. Die Differenz in der Wirksamkeit der beiden Fraktionen kann auf mehrere Ursachen beruhen:

- 1) Das LPS der Fraktion II wird von den schwer löslichen Beimengungen irgendwie lokal festgehalten und an der Resorption gehindert; es kann somit länger eine lokale Funktion im Sinne einer Chemotaxis ausüben. Demgegenüber ist die Fraktion I nach kurzer Zeit in die Blutbahn resorbiert und übt keinen lokalen Effekt mehr aus. Die Differenz beruht also auf dem Unterschied in der Löslichkeit resp. Resorbierbarkeit.

2) Die Leukozytenansammlung erfolgt bei der Fraktion II auf einem prinzipiell anderen Weg als bei der Fraktion I; in der Fraktion II ist ein Stoff vorhanden, der in der Fraktion I fehlt.

3) Es sind an dem Vorgang zwei prinzipiell verschiedene Faktoren beteiligt, beide sind aber sowohl in der Fraktion I wie in der Fraktion II enthalten. Die (rein quantitative) Differenz in der Wirksamkeit beruht darauf, dass für einen maximalen Effekt ein optimales Verhältnis der beiden wirksamen Prinzipien notwendig ist und die Fraktion II diesem optimalen Verhältnis näher kommt als die Fraktion I.

Ob — gemäss der ersten dieser Hypothesen — die Verweildauer des LPS am Ort der Injektion für den lokalen Effekt von Bedeutung ist, bedarf noch weiterer Abklärung. Die Beantwortung der Frage, welches der zweite, für das Zustandekommen der lokalen Leukozytenansammlung *in vivo* essentielle Faktor ist, kann in folgender Weise versucht werden. Es wurde schon eingangs betont, dass die Leukozyten zuerst an der Kapillarwand fixiert werden müssen, ehe ihre Fähigkeit zu wandern sich manifestieren kann. Diese Fixierung ist möglicherweise nicht eine Funktion des Lipopolysaccharids, sondern es kann für sie ein anderes Prinzip verantwortlich sein. Dieses braucht kein direkt und spezifisch auf die Kapillarwand wirkender Stoff zu sein, sondern die Wirkung kann sekundär über eine lokale Gewebsschädigung und dabei freigesetzte, endogene, spezifisch wirkende Stoffe zustandekommen. Sind die Leukozyten lokal fixiert, so beginnen sie zu wandern, und zwar mit der ihnen im Moment gerade eigenen Intensität. Zugeführtes LPS ist also nach dieser Interpretation für die lokale Leukozytenreaktion nicht unbedingt notwendig. Dagegen ist das Ausmass der nun einsetzenden Leukozytenansammlung am Ort des auslösenden Agens abhängig von der Intensität der Wanderung des einzelnen Leukozyten, und diese wird bestimmt durch den Effekt des lokal bzw. im Organismus vorhandenen Lipopolysaccharids; je nach der Höhe der Konzentration des letzteren wird sie gehemmt oder gefördert.

Für das Zustandekommen der hemmenden resp. fördernden LPS-Wirkung auf die Leukozytenansammlung sind zwei Möglichkeiten zu erörtern: 1) Der Effekt kann lokal, am ausgetretenen, aktiv wandernden Leukozyten zustandekommen. Das Ausmass der Beeinflussung wäre vom lokalen Konzentrationsgefälle des LPS abhängig. Es könnte sich demnach um eine „Chemotaxis“ im eingeschränkten Sinne — bei welcher die Wanderungsrichtung unbeeinflusst bleibt — handeln, wie sie R. MEIER und SCHÄR (32) für die LPS-Wirkung auf die Leukozyten *in vitro* wahrscheinlich gemacht haben. 2) Die andere Möglichkeit besteht darin, dass sich der LPS-Effekt schon vorher in der Blutbahn, alle kreisenden

Leukozyten erfassend, abspielt. Für diese zweite These sprechen die Befunde von BUTTER und THOMAS (33), die nach intravenöser Injektion von Lipopolysaccharid am Menschen Blutproben hinsichtlich der Wanderungsgeschwindigkeit der Granulozyten untersuchten und eine gegenüber Kontrollen gesteigerte Wanderung feststellten. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass beide Phänomene eine Rolle spielen.

Die vorgeschlagene Interpretation muss einerseits die Dosis/Wirkungsverhältnisse (hemmende/fördernde Wirkung) bei lokaler, intra-peritonealer Applikation von Bakterien und Bakterienfraktionen erklären, andererseits die Veränderung dieser Reaktion bei zusätzlicher (simultaner und prophylaktischer) Behandlung mit LPS interpretieren.

Einfach zu deuten ist nur die auftretende *Hemmwirkung*. Diese kann bei den Versuchen mit lebenden Bakterien, toten Bakterien und LPS-Fraktionen sowie bei der simultanen Behandlung mit LPS als eine lokale oder allgemeine Hemmwirkung durch zu hohe LPS-Konzentrationen aufgefasst werden (31). Die *geförderte* Ansammlung bei lokaler Applikation von lebenden und toten Bakterien und LPS-Fraktionen (in entsprechenden Dosisbereichen) kann lokal durch das Konzentrationsgefälle an LPS bedingt sein; dabei kann sich die LPS-Wirkung auf die Beschleunigung der Wanderung beschränken, während ein anderer Faktor die für die Auswanderung notwendige Lokalisierung und Anhäufung der Leukozyten in den Kapillaren bestimmt. Es ist aber nicht auszuschliessen, dass bereits ein allgemeiner Effekt resorbierten Lipopolysaccharids ebenfalls eine Rolle spielt. Der Unterschied des lokalen Effektes der Fraktionen I und II kann auf Differenzen in dieser Hinsicht bezogen werden; die sich ergebenden Möglichkeiten wurden bereits diskutiert.

Die Förderung der Leukozytenreaktion durch Vorbehandlung mit LPS kann nicht ohne weiteres mit diesen Mechanismen erklärt werden. Sie kann auf einem primär veränderten Konzentrationsgefälle beruhen, oder aber mit der allgemein auftretenden Resistenzerhöhung gegen zweite Gaben von LPS in Zusammenhang stehen. Diese für die LPS-Toxizität bekannte Erscheinung würde sich auch an den direkt der Einwirkung des LPS unterworfenen Leukozyten zeigen und die Ursache der verschiedenen Ansprechbarkeit darstellen. Das Zusammenspiel der geschilderten Faktoren kann die eintretende Reaktion erklären.

Die Resultate unserer quantitativ orientierten Versuche geben eine erneute Bestätigung dafür, dass unter den Abwehreinrichtungen des Organismus gegen bakterielle Infektionen die lokale Ansammlung von Leukozyten eine wichtige Stellung einnimmt. Im Tierversuch ist ihr Ausmass weitgehend ein Masstab für die Resistenzlage des Versuchstieres.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Es wird eine einfache Methode beschrieben, mit der man lokale Leukozytenansammlungen in der Peritonealhöhle auslösen und quantitativ erfassen kann.

2) Leukozytenansammlungen können durch lokale Injektion von lebenden Bakterien, von abgetöteten Bakterien und von Bakterienfraktionen ausgelöst werden. Die Menge der Leukozyten steht in quantitativer Relation zur angewandten Menge des auslösenden Agens, so dass bei mittleren Konzentrationen ein Optimum erzielt wird und bei höheren Konzentrationen die Zellzahlen wieder abfallen. Bei verschiedenen lipopolysaccharidhaltigen Bakterienfraktionen besteht keine einfache quantitative Parallelität zur emigrationsfördernden Wirkung solcher Stoffe *in vitro*. Die Ursachen dieser Wirkungsverhältnisse werden diskutiert.

3) Eine enge Relation ergibt sich zwischen der leukozytären Reaktion auf lebende Bakterien und der Resistenz der Versuchstiere gegenüber tödlicher Infektion. Tiere mit geringer lokaler Leukozytenreaktion erliegen der Infektion, Tiere mit hoher Leukozytenreaktion überstehen sie. Die Zahl der am Ort der Infektion angesammelten Leukozyten ist ein Masstab für die Resistenz des Tieres.

4) Die Stärke der lokalen Leukozytenreaktion auf intraperitoneale Infektion wie auf intraperitoneale Applikation von Bakterienprodukten kann durch zusätzliche Behandlung des Tieres mit bakteriellem Lipopolysaccharid beeinflusst werden. Parallel zu der Leukozytenreaktion auf lebende Bakterien sinkt oder steigt die Zahl der überlebenden Tiere. Simultane Behandlung setzt sie bei geeigneter Dosierung herab, prophylaktische erhöht sie, besonders bei hohen Infektionsdosen. Die Leukozytenansammlung wie die Infektionsresistenz scheinen somit von einer bestimmten Reaktion auf gegebene Lipopolysaccharid-Konzentrationsverhältnisse im Organismus abhängig zu sein.

LITERATURVERZEICHNIS

1. — Literaturübersicht bei: R. MEIER, Biochemische Kausalsammenhänge des Entzündungsvorganges. In: Medizinische Grundlagenforschung, Bd. II, hgb. v. K. Fr. Bauer, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959.
2. — MEIER, R., DESAULLES, P. und SCHÄR, B. Analyse der bio-

- chemischen Ursachen der entzündlichen Zellreaktion, *Verh. Naturf. Ges. Basel*, 1956, 67, 447.
3. — MEIER, R. und SCHÄR, B. Spezifische Wirkung einiger tierischer und bakterieller Polysaccharide auf Leukozyten in vitro. *Experientia*, 1954, 10, 376.
 4. — MEIER, R. und SCHÄR, B. Vorkommen leukocytotaktischer Polysaccharide in bakteriellem, pflanzlichem und tierischem Ausgangsmaterial. *Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chemie*, 1957, 307, 103.
 5. — MEIER, R. und SCHÄR, B. Produktion von leukozytenemigrationsfördernden Stoffen durch grampositive Keime in vitro. *Experientia*, 1957, 13, 492.
 6. — HARRIS, H. Chemotaxis of Granulocytes. *J. Path. Bact.*, 1953, 66, 135.
 7. — LANDY, M. and PILLEMER, L. Increased resistance to infection and accompanying alterations in properdin levels following administration of bacterial lipopolysaccharides. *J. exp. Med.*, 1956, 104, 383.
 8. — BOEHME, D. and DUBOS, R. J. The effect of bacterial constituents on the resistance of mice to heterologous infection and on the activity of their reticulo-endothelial system. *J. exp. Med.*, 1958, 107, 523.
 9. — MEIER, R. und NEIPP, L. Verstärkung der chemotherapeutischen Wirkung von Sulfonamiden durch zusätzliche Behandlung mit chemotaktisch wirkenden Polysacchariden aus Harn und Bakterien. *Schweiz. med. Wschr.*, 1956, 86, 249.
 10. — NEIPP, L., KUNZ, W. und MEIER, R. Selektive Erhöhung der „natürlichen“ Resistenz gegenüber bakterieller Infektion durch Polysaccharide und andere Pharmaka. *Schweiz. med. Wschr.*, 1959, 89, 532.
 11. — BERGMANN, H., BUSCHMANN, G., DOERING, P., FRITZE, E. und WENDT, F. Der Einfluss bakterieller Pyrogene (Lipopolysaccharide) auf die Phagozytoseaktivität der Granulozyten und auf die elektrische Oberflächenladung menschlicher Blutzellen in vivo. *Klin. Wschr.*, 1954, 32, 500.
 12. — FRITZE, E. und WENDT, F. Zum Wirkungsmechanismus bakterieller Lipopolysaccharide. I. Ueber einen sekundären endogenen Plasmfaktor mit Phagozytosewirkung. *Klin. Wschr.*, 1955, 33, 523.
 13. — FRITZE, E. und WENDT, F. Zum Wirkungsmechanismus bakterieller Lipopolysaccharide. II. Die Phagozytoseaktivität

- menschlicher Blutgranulozyten unter dem Einfluss bakterieller Lipopolysaccharide *in vitro*. *Klin. Wschr.*, 1955, 33, 575.
14. — KATO, L. and GÖZSY, B. Studies on the effects of phagocytic stimulation on microbial disease. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1956, 34, 580.
 15. — BIOZZI, G., BENACERAFF, B. and HALPERN, B. N. The effect of Salm. typhi and its endotoxin on the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system in mice. *Brit. J. exp. Pathol.*, 1955, 36, 226.
 16. — NOYES, H. E., MCINTURF, Ch. R. and BLAHUTA, G. J. Studies on Distribution of Escherichia Coli-Endotoxin in Mice. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1959, 100, 65.
 17. — PILLEMER, L. The nature of the properdin system and its interaction with polysaccharide complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 1956, 66, 233.
 18. — SELYE, H. Use of "Granuloma pouch" technic in the study of antiphlogistic Corticoids. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, 82, 328.
 19. — SOBERON, G. and COHEN, P. P. Production of leucocytic Exudates in rat granuloma pouch. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1959, 100, 531.
 20. — WEBB, R. L. Peritoneal reactions in the white rat, with especial reference to the mast cells. *Americ. J. Anat.*, 1931/32, 49, 283.
 21. — ASBOE-HANSEN, G. and GLICK, D. Influence of various Agents on mast cells isolated from rat peritoneal fluid. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1956, 92, 357.
 22. — FRUHMANN, G. J. Mobilization of Leucocytes into the Peritoneal Fluid. *Experientia*, 1959, 15, 225.
 23. — HAMBURGER, H. J. Die Technik des Arbeitens mit Phagozyten zu biologischen Zwecken. In: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, hgb. v. E. ABDERHALDEN, Abt. IV, Teil 4, Blut und Lymphe 2, Ste., 953 (1927).
 24. — CSALAY, L., LUDANY, G. und VAJDA, G. Die Wirkung des Dextrans auf die Bakterienphagozytose der Leukozyten. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1955, 104/2, 186.
 25. — STÄHELIN, H., SUTER, E. and KARNOWSKY, M. L. Studies on the interaction between phagocytes and tubercle bacilli. *J. exp. Med.*, 1956, 104, 121.
 26. — SUTER, E. The multiplication of tubercle bacilli within normal phagocytes in tissue culture. *J. exp. Med.*, 1952, 96, 137.
 27. — ROSENOW, G. Experimentelle Erzeugung aseptischer und bak-

- terieller Entzündungen. In: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, hgb. v. E. ABDERHALDEN, Abt. VIII, exper. Morphologie, Teil 2, Ste. 1, (1932).
28. — HORVATH, G., LUDÁNY, G. und VAJDA, G. Die Wirkung von Cortison auf die Auswanderung der Leukozyten und ihre Bakterienphagozytose. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1955, 100, 357.
29. — LUCKÉ, J., STRUMIA, P., MUDD, R., McCUTCHEON, E. R. and MUDD, J. On the comparative phagocytic activity of macrophages and polymorphonuclear Leucocytes. *J. Immunology*, 1933, 24, 455.
30. — MACKANESS, G. B. The action of drugs on intracellular tubercle bacilli. *J. Path. Bact.*, 1952, 64/2, 429.
31. — MEIER, R., DESAULLES, P. A. und SCHÄR, B. Verschiedenartiger Wirkungstypus bakterieller „entzündungserregender“ Substanzen und anderer „Reizstoffe“. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, 1955, 224, 104.
32. — MEIER, R. und SCHÄR, B. Ursächliche Bedingungen der durch Polysaccharide ausgelösten Leukozytenemigration und chemotaktischen Reaktion in Gewebekulturen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 1958, 234, 102.
33. — BUTTER, U. und THOMAS, G. Der Einfluss von Lipopolysacchariden auf die Wanderungsgeschwindigkeit menschlicher Granulozyten. *Münch. med. Wschr.*, 1956, 98, 1240.

